



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0095340 호
Application Number 10-2003-0095340

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 23일
Date of Application DEC 23, 2003

출 원 인 : 주식회사 셀론텍
Applicant(s) CELLONTECH CO.,LTD.

2004년 12월 27일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【유형】 특허 출원서
【리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.12.23
【발명의 명칭】 연골치료제 조성물 및 그 사용방법
【발명의 영문명칭】 a composition for cartilage therapeutics and a using method thereof
【출원인】
【명칭】 주식회사 셀론텍
【출원인 코드】 1-2001-007924-4
【대리인】
【성명】 홍성표
【대리인 코드】 9-2000-000223-9
【포괄위임등록번호】 2002-041199-6
【대리인】
【성명】 최병길
【대리인 코드】 9-2001-000513-1
【포괄위임등록번호】 2002-041200-9
【발명자】
【성명의 국문표기】 장정호
【성명의 영문표기】 CHANG,Cheong Ho
【주민등록번호】 650729-1002115
【우편번호】 137-040
【주소】 서울특별시 서초구 반포동 삼호기든아파트 503동 802호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 고청관
【성명의 영문표기】 KO,Chang Kwon
【주민등록번호】 711025-1019234
【우편번호】 136-113
【주소】 서울특별시 성북구 길음3동 동부센트레빌 아파트 110동
2002호
【국적】 KR

【명자】

【성명의 국문표기】 장재덕
 【성명의 영문표기】 JANG, Jae Deog
 【주민등록번호】 650222-1684316
 【우편번호】 139-222
 【주소】 서울특별시 노원구 중계2동 웃데아파트 7동 405호
 【국적】 KR

【명자】

【성명의 국문표기】 이은영
 【성명의 영문표기】 LEE, Eun Young
 【주민등록번호】 760110-2489918
 【우편번호】 140-190
 【주소】 서울특별시 용산구 후암동 120-8번지 씬하우스 101호
 【국적】 KR

【명자】

【성명의 국문표기】 최정용
 【성명의 영문표기】 CHOI, Jeong Yong
 【주민등록번호】 730205-1523014
 【우편번호】 122-070
 【주소】 서울특별시 은평구 역촌동 70-14번지
 【국적】 KR
 【사청구】 청구
 【지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
 홍성표 (인) 대리인
 최병길 (인)

수수료

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	14	면	14,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	12	항	493,000	원
【합계】	536,000 원			
【감면사유】	중소기업			
【감면후 수수료】	268,000 원			

1. 요약서·명세서(도면)_1종 2. 중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1종

【요약서】

【약】

본 발명은 슬(무릎)관절이나 측관절 특히 임상 증세가 있는 대퇴골 관절 연골 (측, 내측, 활차면) 결손 부위 및 거골의 골연골 결손 부위에 임상적으로 사용할 수 도록 하는 연골치료제 조성을 및 그 사용방법에 관한 것이다.

이는 특히, 인간이나 동물 등의 숙주로부터 분리되어 증식 또는 분화된 연골 세 성분과 이에 혼합되는 트롬빈 및 피브리노겐을 포함하는 피브리노겐 매트릭스가 혼 되는 구성으로 이루어진다.

또한, 트롬빈과 연골세포 성분 및 피브리노겐 매트릭스의 혼합물을 연골의 결손 위에 주입하여 고형화 시키도록 하는 연골치료제 조성물의 사용방법을 제공한다.

이에 따라서, 인간이나 동물에게 수술과 관련한 부담을 덜 주면서 보다 빠르고 과정으로 연골 생성을 도모할 수 있으며, 관절경을 이용하여 이식술을 수행할 수 도록 하여 보다 안전하고 간편하게 시술하는 것이다.

【표도】

도 1a

【인어】

피브리노겐, 트롬빈, 콜라겐, 히알루로닉산, 연골치료제

【명세서】

【발명의 명칭】

연골치료제 조성물 및 그 사용방법(a composition for cartilage therapeutics
a using method thereof)

【면의 간단한 설명】

도1a는 본 발명에 따른 연골세포 이식용 매트릭스에서 피브리노겐과 트롬빈 투
농도에 따른 강도를 측정한 그래프이다.

도1b는 도1에 따라 매트릭스에서 피브리노겐을 A:200mg/mL, B:160mg/mL,
20mg/mL 투입했을 때의 매트릭스 사진이다.

도2a는 본 발명에 따른 매트릭스가 이식되는 연골 결손 부위를 다듬은 모습을
타낸 사진이다.

도2b는 본 발명에 따른 매트릭스를 이식 부위에 이식한 모습을 나타낸 사진이다

도2c는 본 발명의 다른 실시예에 따른 골막 봉합 후 연골치료제 조성물의 주입
태를 도시한 사진이다.

도3은 본 발명의 다른 실시예에 따라 결손부위에 접합공을 미리 형성한 후 d연
치료제 조성물을 주입한 그림을 도시한 사진이다.

도4는 본 발명에 따른 피브린 매트릭스에서의 연골세포 분화패턴을 도시한 사진
다.

도5는 본 발명의 다른 실시예에 따라 10%의 콜라겐과 10%의 히알루로닉산이 포함된 피브리노겐 매트릭스에서 연골세포의 분화패턴을 도시한 사진이다.

【설명의 상세한 설명】

【설명의 목적】

【설명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 사람이나 동물 등의 숙주에서 슬(무릎) 관절이나 측관절 특히 임상 세가 있는 대퇴골 관절 연골(외측, 내측, 활차면) 결손 부위 및 거골의 골연골 결부위에 임상적으로 이식할 수 있도록 하는 연골치료제 조성물 및 그 사용방법에 한 것이다.

일반적으로 척추동물의 관절을 이루는 연골 조직은 한번 손상되게 되면 정상적으로 생체 내에서 재생이 되지 않는다.

이러한 관절의 연골조직이 손상될 경우 심한 통증과 함께 일상 활동에 제한을 끼 되며, 만성화될 경우 치명적인 퇴행성 관절염을 유발하게 되어 정상적인 생활이 직업적인 활동을 방해하게 된다.

그리고, 상기와 같은 관절연골 손상을 치료하기 위해서는 일부에서는 손상된 판면을 갈아서 부드럽게 하는 치료나 판절면에 미세 골절을 유발하거나 작은 구멍을 는 치료법이 이용되고 있는 실정이다.

그러나, 이러한 치료법은 단지 몇 주 후에 증상이 다시 재발되어 정상적인 생활 복귀를 불가능하게 되고, 이러한 치료를 위하여 만들어진 조직은 섬유성 조직으로 정상적인 연골 조직과는 완전히 질적으로 다른 조직이다.

더욱이, 관절의 연골조직 손상이 심한 경우에는 연골조직의 재생이 불가능하게 되고, 심한 손상에 의해 연골조직이 재생 불능 상태에 처한 경우에는 불가피하게 관절을 완전히 제거하고 금속이나 플라스틱류를 이용한 인공 관절로 치환하는 방을 사용하였다.

그리고, 현재까지는 이러한 인공 관절 치환술이 재생 불능의 연골 손상에 대한 일한 치료법으로 알려져 있다.

상기와 같은 인공 관절 치환술은, 미국에서 무릎 관절에만 매년 300,000례 이 이 사용되고 있는 실정이다.

그러나, 인공 관절 연골은 기구로서 그 자체의 수명이 10년 내외로 영구적으로 용될 수 없으며, 비용적인 면에서도 기구 자체의 가격만으로도 건당 500만원 내외 경제적인 부담도 크다.

더욱이, 이러한 인공 관절 연골은 활동이 많은 젊은 사람에게 사용하기에는 합증 발생 빈도가 너무 높게 보고 되고 있어서 유용한 치료법으로 인식되지 못하고 있다.

최근, 손상된 관절 연골의 치료를 위해 조직 공학에 기초를 둔 새로운 치료법으로서 자기유래 연골세포 이식술이 각광 받고 있다.

이 기술은 New York에 있는 Hospital for Joint Disease에서 처음 연구 되었고, 웨덴 (Sweden)에 있는 University of Gothenburg와 Sahlgrenska University Hospital에서 발견 되었다.

상기와 같은 자기유래 연골세포 이식술은, 무릎 관절 연골이 손상된 환자의 연부위 중 사용이 많지 않은 연골을 채취한 후 연골 세포를 분리하고, 상기 연골 세를 배양하여 연골 결손 부위를 치료할 만큼의 연골 세포수를 획득하며, 배양된 연세포를 환자의 연골 결손 부위에 이식하여 환자의 관절 연골을 복원시키는 방법이

이러한, 자기 유래 연골 세포 이식술은 근본적인 관절 치료제로서 그 성능이 여겨지 임상결과를 토대로 입증 되었으나 연골 세포 치료제 이식 시 골막을 채취해야 하고 환부에 이식한 후 연골 세포 치료제를 주입하는 과정이 수반되어야 한다.

또한, 골막 채취 시 무릎의 많은 절개와, 수술 부위와 골막의 불완전한 밀봉에 따른 연골 세포 치료제의 소실, 골막을 관절 결손 부위에 봉합 시 시간이 많이 소요되고 있는 단점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 상기와 같은 단점을 보완하기 위한 것으로서 그 목적은, 연골치료제 이식 시 골막의 채취, 봉합, 골막과 이식 부위의 불완전한 밀봉, 많은 부위의 절개에 따른 이식술의 어려움과 수술 소요 시간을 단축시킬 수 있도록 하는 연골치료제 조성 및 그 사용방법을 제공하는데 있다.

또한, 연골세포 성분, 트롭민과 피브리노겐 매트릭스 성분을 혼합 사용하여 고화 함으로써 치료제의 손실을 최소화 하고, 피브리노겐 매트릭스와 세포의 상호 작용에 의해 보다 완전한 연골 재생의 효과와 더 나아가 수술 시간의 단축과 관절경에

해 사용이 가능하게 하도록 하는 연골치료제 조성물 및 그 사용방법을 제공하는데
다.

발명의 구성 및 작용】

본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 숙주로부터 분리되어 증식 또는
화된 연골의 세포성분과 트롬빈, 피브리노겐 매트릭스의 혼합물로 이루어지는 연골
치료제 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은, 숙주로부터 분리되어 증식 또는 분화된 연골세포 성분을 준비
는 단계:

트롬빈을 준비하는 단계:

피브리노겐 매트릭스를 준비하는 단계:

연골의 결손부위를 처리하는 단계: 및,

결손부위에 연골세포 성분과 트롬빈, 그리고 피브리노겐 매트릭스를 혼합한 후
입하는 단계를 포함하는 연골치료제 조성물의 사용방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은, 조직과 장기를 대체하는데 기여한 것은 조직공학 (tissue
engineering)에 의한 것으로, 조직의 기능을 향상, 유지 및 회복시킬 수 있다.
이상과 같은 조직공학을 이용하는 본 발명은, 사람이나 동물등의 숙주로부터 분
리되어 증식 또는 분화된 연골의 세포성분에 트롬빈과 피브리노겐 매트릭스를 혼합하
여 형성된다.

그리고, 본 발명에서는 조직 대체제로 특정한 세포와 성장 인자 (growth factor)

이 포함될 수 있는 기질 (matrix)을 필요로 하고, 기질로는 세포밖 기질

extracellular matrix : ECM)의 구성 성분 같은 생체 내 성분과 기질 대체물인 천연

분자 (natural polymer) 등이 이용되었다.

더하여, 상기 세포와 매트릭스 (matrix)의 상호작용은 직접적으로 세포유착 (cell

hesion), 이주 (migration), 성장 (growth), 분화 (differentiation), 그리고 소멸

apoptosis)을 조장한다.

또한, 시토킨 (cytokine)과 성장인자 (growth factor)의 활성을 조절하며 세포내

호 전달을 활성화 시켜 조직의 빠른 생성, 빠른 회복의 결과를 가져온다.

한편 본 발명의 연골치료제 사용 방법은, 먼저 사람이나 동물등으로 부터 분리

후 증식 또는 분화되는 연골 세포 성분을 준비하고, 응고인자로 사용되는 트롬빈

thrombin)을 준비한다.

그리고, 상기와 같은 연골세포 성분및 트롬빈과 혼합할 피브리노겐 매트릭스 즉

피브리노겐 (fibrinogen), 콜라겐 (collagen), 히알루로닉산 (hyaluronic acid) 및 글

코스아미노글리칸 (glycosaminoglycan: 이하 "GAG"라 한다.), 아프로티닌 (aprotinin)

의 성분을 준비한다.

이때, 피브리노겐이 반드시 포함되는 피브리노겐 매트릭스는, 피브리노겐

fibrinogen)만을 적절한 농도로 단독 사용하거나 피브리노겐에 다른 매트릭스 성분

콜라겐, 히알루로닉산, GAG, 아프로티닌 등을 적정량 혼합하여 피브리노겐 매트릭

를 형성한다.

더하여, 상기 아프로터닌의 역할은, 트롬빈에 의한 피브리노겐의 분해를 억제하
즉 하여 일정형상으로 연골치료제(트롬빈, 연골세포성분, 피브리노겐의 혼합물) 혼합
고형화되는 연골치료제의 형태가 오랜 기간 동안 유지될 수 있게 한다.

이때, 상기 연골 치료제를 이식할 연골 결손 부위는 먼저 다듬어진 후 이식을
해 이식 부위의 내부에 지름 2-3 mm, 깊이 3-5 mm의 구멍을 뚫은 후 트롬빈을 먼저
사하여 진다.

그리고, 트롬빈이 분사된 연골결손 부위에 연골세포 성분, 트롬빈 및 피브리노
매트릭스가 혼합된 연골치료제를 결손 부위에 주입한다.

계속하여, 상기 연골치료제가 주입된 결손부위의 상측에 연골 세포 치료제의 생
과 형태 유지를 위하여 고농도의 트롬빈을 뿌려준다.

본 발명에서, 상기 연골세포 성분은, 정상 연골 조직을 적당한 효소를 이용하여
포로 분리한 후 배양액을 첨가한 후 배양하여 최종 100만개/mL 이상의 연골 세포
함유하는 것을 사용한다.

또한, 상기 피브리노겐은, 동결 건조 상태의 피브리노겐(fibrinogen)을 DMEM 배
액 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 비롯한 Ham's F-12, DMEM/F-12, IMDM
scove's Modified Dulbecco's Medium, McCoy's 5A Medium, MEM (Minimum
essential Medium), α-MEM, RPMI 1640, Leibovitz's L-15 Medium, Eagle's basal
dium과 같이 일반적으로 사용하는 세포 배양액으로서 복원시킨다.

그리고, 상기 트롬빈 역시 동결 건조 상태의 트롬빈(thrombin)을 DMEM 배양액을
비롯하여 상기에서 열거한 배양액으로 복원시킨다.

또한, 상기 피브리노겐에는 콜라겐 (collagen), 히알루로닉산 (hyaluronic acid)

“GAG, 아프로티닌등에서 선택되는 어느 하나 이상이 소정의 농도로 혼합되어 피브

노겐 매트릭스를 형성한다.

이때, 상기 피브리노겐 (fibrinogen)은, 혈액 내에 존재하는 물질로서 출혈이 발생을 때 트롬빈 (thrombin)과 반응하여 피브린 (fibrin)의 형태로 변형되고, 상기 트롬빈에 첨가되는 CaCl_2 와 factor X III에 의해 응고되어 저혈 작용을 하는 것이다.

또한, 상기 동결건조 상태의 피브리노겐을 용해 하는 배양액은, 10% 이하의 S(fetal bovine serum: FCS (fetal calf serum)), calf serum, horse serum 및 man serum을 첨가할 수 있으며, 이에 미생물의 감염을 막기 위하여 페니실린 (penicillin G), 스트렙토마이신 (streptomycine) 등의 항생제 및 카나마이신 (kanamycin), 앰포테리신 B (amphotericin B), 니스타틴 (nystatin), 젠타마이신 (gentamycin) 등의 항진균제를 적량 첨가할 수 있다.

더하여, 상기 피브리노겐을 용해하는 배양액은, McCoys 5A, Eagle's basal 배지, Glasgow 최소필수 배지, Ham's F-12 배지, Iscove's modified Dulbecco's 배지, Leibovitz' L-15 배지, RPMI 1640 배지등 일반적으로 사용되는 세포배양용 배지는 모두 사용가능하다.

본 발명을 피브리노겐 매트릭스의 구체적인 실시예를 살펴보면, 상기 피브리노겐은, 이식 부위의 상태와 환자 상태를 고려하여 20mg/mL 내지 200mg/mL 농도 범위에 단독으로 사용한다.

이때, 상기 피브리노겐은, 고농도일때 비교적 단단하여 조밀한 매트릭스를 형성
나 분해시간이 증가하여 사용후 이물감 등이 느껴지게 되며, 저농도일때는 조직에
의 분해는 신속하게 이루어 지나 엉성한 매트릭스를 형성하게 되어 연골로 대체되
힘들게 되는 단점이 있는 것이다.

더하여, 상기 피브리노겐 매트릭스는, 20mg/mL 내지 200mg/mL의 피브리노겐에
01mg/mL 내지 20mg/mL의 콜라겐, 0.1mg/mL 내지 20mg/mL의 히알루로닉산 또는,
1mg/mL 내지 20mg/mL의 GAG(glycosaminoglycan), 1~3000KIU/mL 아프로토닌등을 단
또는 복합적으로 혼합하여 사용한다.

상기와 같은 콜라겐, 히알루로닉산, GAG, 아프로토닌등은 숙주내에 존재하는 물
로 한정된 농도 이상으로 들어가더라도 세포에 미치는 영향이 크게 달라지지는 않
나 경화시간이 증가되게 되어 수술시간이 지연되는 결과를 초래하게 된다.

그리고, 상기와 같은 아프로토닌은 생체내에서 피브린의 분해를 억제하여 저혈
용을 도와주는 물질로서 많이 첨가될수록 피브린의 분해 속도가 더디기에 농도를
절하면 매트릭스의 분해 속도를 조절할 수 있다.

일반적으로 척추동물의 연골은, 연골 세포(chondrocyte)와 기질로 이루어져 있
며, 기질의 대부분은 콜라겐(collagen)과 히알루로닉산(hyaluronic acid)을 포함하
GAG로 이루어져 있고, 혈관이 존재하지 않아 활액(synovial fluid)으로부터 영양
을 공급 받는다.

또한, 활액의 주성분은 히알루로닉산(hyaluronic acid)으로써 이와 같은 성분을
복합 사용 하였을 때 우수한 연골 재생 능력을 보이는 것이다.

그리고, 본 발명의 연골치료제에는 준비된 0.01IU/mL 내지 50IU/mL의 트롬빈이 함되어 연골세포 성분과 피브리노겐 매트릭스를 혼합할 때 트롬빈이 피브리노겐을 브린으로 변화시킨다.

이때, 상기 연골치료제의 혼합률에 투입되는 트롬빈의 농도에 따라 연골치료제 경화 속도를 조절 할 수 있으며, 피브린 매트릭스의 물성 또한 조절이 가능하다.

더하여, 상기 트롬빈의 농도가 저농도일때는 매트릭스가 굽은 섬유질로 이루어며, 세공의 사이즈가 크게되어 세포와 생리활성 물질을 포함하기에 유리하나 경화 간이 지연되어 소귀의 목적을 달성하기 힘들게 된다.

또한, 상기 트롬빈의 농도가 고농도일때는, 매트릭스가 얇은 섬유질로 이루어져 11공의 사이즈가 적게 되어 세포의 침투를 차단하면서 내부성장을 용이하게 하여주 경화시간이 빨라져 조성물을 혼합하는 동안에 경화될 수 있어 작업성이 극히 저하된다.

이에 따라, 상기 트롬빈의 농도는 0.01IU/mL 내지 50IU/mL가 바람직하며, 상기 같이 투입되는 트롬빈은 1-10분 사이에 경화되며, 본 발명의 매트릭스에 혼합할 때 저농도의 트롬빈을, 조성물의 투입 전후에 사용되는 트롬빈의 농도는 고농도로 사용되는 것이 바람직 하다.

이에 의하여, 연골조직 재생에 적합한 정도의 기계적 강도 및 유연성을 갖도록 한다.

또한, 연골순상부위에서 나타날수 있는 다양한 입체 구조에 맞도록 그 형태를 쉽게 변형시킬 수 있어 수술의 편의를 도모하면서도 이식된 후에는 일정한 형태를

지하면서 손상부위에 지속적으로 위치하여 함께 이식된 연골세포의 체내 증식 및

화를 촉진시킬 수 있게 된다.

더하여, 본 발명에 연골세포 이식용 조성물이 이식되는 결손 부위는, 먼저 연골
제제를 이식할 연골 결손 부위를 다클고 환부의 크기에 따라 이식 부위의 내부에
틈 2~3 mm, 깊이가 약 3~5 mm의 구멍을 0개 내지 5개 뚫고 저혈한 후, 환부의 표면
100 IU/mL 내지 1000 IU/mL의 고농도의 트롬빈을 투여주어 연골치료제의 접착력을
높이도록 한다.

이때, 상기 트롬빈은, 연골치료제를 이식할 연골 결손 부위와 연골치료제가 밀
하게 결합하여 연골 재생의 밀도를 높이면서 외부로부터의 충격에 의해서도 견딜
있도록 하는 역할을 수행한다.

또한, 연골치료제 조성물을 동물이나 사람의 연골 결손부위에 주입한다.
이때, 상기 연골치료제 조성물의 주입은 연골 결손 부위의 구멍 뚫은 부위부터
천천히 주입하고 나머지 결손 부위를 모두 채워주는 순서로 주입한다.

그리고, 피브리노겐이 트롬빈과 결합하여 피브린이 되는 시간은 농도에 따라 다
르므로 적정 시간인 약 1~10분 안에 결손 부위에 연골치료제를 주입하도록 한다.

또한, 상기 결손부위의 연골치료제 조성물을 이식시에는, 100 IU/mL 내지 1000
/mL의 고농도의 트롬빈을 이식된 연골세포 성분-트롬빈-피브리노겐으로 이루어진
골치료제 조성을 위에 투여 주어 생착과 형태 유지를 도와주며, 이에 의하여 보호
이 형성되어 연골이 재생되는 동안 연골치료제를 보호한다.

그리고, 상기 트롬빈의 등작에 의해 피브리노겐이 피브린으로 전환되면서 완전히 굳어지도록 약 5분 정도 시술 부위를 방치한다.

【실험예1】

연골치료제 이식에 사용 되는 여러 가지 매트릭스의 적절한 물리, 화학적 특성 측정하기 위해 먼저, 시판되는 동결 건조 상태의 트롬빈도 2 IU/mL ~ 10 IU/mL의 도가 되도록 용해시킨다.

이때, 2 IU/mL ~ 10 IU/mL의 농도의 트롬빈은 주 사용 매트릭스인 피브리노겐을 브린으로 변형시키기 위하여 첨가하는 것이다.

그 외에 첨가되는 콜라겐은 0.01 ~ 20 mg/mL, 하알루로닉산은 0.1 ~ 20 mg/mL, G는 0.1 ~ 20 mg/mL의 농도가 되도록 각각의 매트릭스를 준비한다.

이렇게 준비된 각각의 매트릭스를 혼합하여 조성된 경도 (hardness), 강도 (strength) 및, 굳힘 강도 (bending strength) 등을 측정해 보았다.

먼저, 20 mg/mL ~ 200 mg/mL 농도의 피브리노겐 1mL 과 2 IU/mL ~ 10 IU/mL 농도 트롬빈 1mL을 혼합 하여 각각의 조성물의 경도 (hardness), 강도 (strength)를 측정하였다.

또한, 실제의 연골치료제와 위 농도와 같은 매트릭스를 혼합하여 형성되는 조성의 강도 (strength)를 측정 하였다.

그 결과 도1a에서와 같이, 여러 임상 실험을 통해 연골세포 성분-트롬빈-피브리겐 혼합물로 이루어진 연골치료제 조성물을 이식할 때 적절한 강도는 약 160 ~ 170 mg으로 위 측정 결과 트롬빈은 2 IU/mL 이고, 피브리노겐 20mg/mL 일 때의 조성물

강도는 166 g/cm²이고, 트롬빈 4 IU/mL이고 피브리노겐이 각각 160, 200 mg/mL 때 조성물의 강도는 각각 170, 165 g/cm², 트롬빈 8 IU/mL이고 피브리노겐이 각 160, 200 mg/mL 일 때 조성물의 강도는 각각 170, 166 g/cm², 트롬빈 10 IU/mL 이 피브리노겐이 각각 160, 200 mg/mL 일 때 조성물의 강도는 각각 171, 169 g/cm² 라 측정치를 얻게 되고, 이러한 결론에 의해 이식 시 적절한 피브리노겐과 트롬빈의 도와 그에 따른 성상을 도1b에서와 같이 얻을 수 있었다.

이때, 상기 피브리노겐의 농도에 따른 물성의 차이는 도1b의 원쪽으로부터 200mg/mL, B:160mg/mL, C:20 mg/mL 일때를 나타낸 사진과 같은 성상을 보였다.

또한, 히알루로닉산, 콜라겐, GAG 등을 첨가한 연골세포 성분-트롬빈-피브리노겐로 이루어진 연골치료제 조성물의 강도 측정 결과는 위에서 적절한 피브리노겐과 트롬빈의 농도에 각 매트릭스, 즉, 콜라겐, 히알루로닉산, GAG 등을 혼합하여 각각 단합을 측정하였을 때 위에서 측정된 결과 보다 약 1~6 g/cm² 정도의 강도가 감소하 약 154 ~159 g/cm² 정도의 강도 측정치를 얻을 수 있었다.

이러한 강도의 감소는, 콜라겐, 히알루로닉산, GAG 등의 매트릭스 성분량을 조하거나 혼합하여 사용함으로써 조절할 수 있다.

그리고, 환자의 특성에 따라 매트릭스의 구성이 달라지므로 위에서 언급한 피브리노겐과 트롬빈의 농도에 콜라겐, 히알루로닉산, GAG 등의 매트릭스 성분을 혼합 사 한다.

더 나아가, 나이가 많은 환자일 경우 콜라겐이나 히알루로닉산을 첨가하고 심한
경상이나 교통 사고 등에 의한 젊은 환자일 경우 GAG나 히알루로닉산 등을 혼합 사
하는 조성물을 사용하였을 경우에 연골 생성에 효과를 볼 수 있다.

[실험예2]

상기와 같이 투입되는 피브리노겐과 트롬빈이 연골치료제로 사용하기 적합한 강
인 160-170 g/cm² 정도의 강도를 떠는데 소요되는 중합시간 (Polymerization
time) (sec)은 표1과 같이 나타난다.

[표 1]

Fibrinogen Conc. - mg/mL, Thrombin Conc. - IU/mL				
Thrombin	2	4	8	10
Fibrinogen				
20	225	213	160	118
40	246	236	181	126
80	281	275	208	179
120	312	299	231	199
160	359	325	269	216
200	379	367	301	290

즉, 저농도의 트롬빈에서는 늦은 중합시간이 관찰되며, 약 5μm 이상의 세공사이
를 갖는 얇은 섬유질 구조를 형성하고, 고농도의 트롬빈에서는 빠른 중합시간이 관
되고 1μm 이하의 작은 세공사이즈 구조를 형성하게 된다.

그리고, 상기와 같은 트롬빈과 피브리노겐으로 이루어진 조성물은 연골치료제로 사용 가능한 강도인 150-180g/cm² 정도의 강도를 유지하는 시간이 2-7분 정도 소요하는 것을 알 수 있다.

【시례 1】

절경에 의해 연골치료제 조성물을 주입한 경우.

저, 숙주인 동물이나 사람으로부터 연골 조직을 채취하여 조직으로부터 세포를 분한 후 약 배양하여 0.3~0.5 mL의 DMEM 배양액에 900 만개 ~ 1500만개 이상의 연골포로 이루어진 연골치료제를 만든다.

리고, 의약품으로 시판되는 피브린 실린트를 준비한 후 동결 건조 상태의 피브리노의 농도가 100 mg/mL ~ 200 mg/mL 가 되도록 바이알에 DMEM 배양액을 넣어 용해시다.

한, 동결 건조 상태의 트롬빈은 500 IU/mL의 농도로 용해시킨 후 트롬빈 용액을 연골치료제에 1 IU/mL ~10 IU/mL의 농도가 되도록 넣어준다.

상의 과정이 끝난 후 환자의 무릎을 관절경을 이용하여 연골 결손 부위를 다듬어 식할 준비를 한다.

리고, 연골 손상 부위를 수술 도구를 이용하여 깨끗이 다듬은 후 손상 부위 안에 술용 드릴 등을 이용하여 지름 3mm, 깊이 5mm의 구멍을 결손 부위 크기에 따라 3개지 5개를 뚫어준다.

후, 연골과 뼈의 작은 덩어리들을 제거한 후 지혈을 하여 이식 준비를 끝낸다.

식준비가 끝난 후 연골세포 성분과 트롬빈, 피브리노겐이 적어도 포함되는 피브리겐 매트릭스를 혼합하여 연골치료제를 준비한다.

때, 피브리노겐은 트롬빈과 반응하여 피브린으로 된 후 응고가 되므로 5분 이내에 식 부위에 이식해야 한다.

속하여, 환자의 연골치료제 조성물의 이식 부위에 미리 준비된 500 IU/mL 트롬빈 액을 스프레이팁 등을 이용하여 뿌려준 후 거즈 등으로 살짝 닦아준다.

어서, 연골세포 성분과 트롬빈, 피브리노겐이 혼합물로 이루어진 연골치료제 조성을 주사기 등을 이용하여 미리 환부에 뚫어 놓은 구멍부터 천천히 주입을 한 후 전을 주입한다.

리고, 상기 조성물을 주입할 때 신속하게 해야 하며 거품이 일지 않게 하고, 주입 끝나자마자 500 IU/mL의 고농도의 트롬빈 용액을 스프레이팁 등을 이용 끌고투 뿐만이다.

■ 시례 2)

결경 하에서 연골세포 성분, 트롬빈, 피브리노겐의 혼합물로 이루어진 조성물에 콜겐을 첨가한 연골치료제를 이식하는 경우.

기에서 기술한 바와 같이 연골세포 성분과, 트롬빈, 피브리노겐을 준비한다.

리고, 관절에서 탄력이 떨어지는 환자의 경우 탄력성을 보강하고 연골 재생에 효과 거두기 위해 콜라겐을 혼합한 피브리노겐 매트릭스를 사용하여 이식할 수 있다.

기 피브리노겐 매트릭스는, 피브리노겐과 이에 첨가되는 콜라겐, 히알루로닉산, G 등으로 이루어져 있으며, 피브리노겐과 콜라겐 등을 복합 사용할 때 환자의 경우

파라 다르지만 50세 전, 후 남자의 경우 피브리노겐 매트릭스 농도의 1/10 내지

5 정도를 단독 또는 혼합하여 사용한다.

를 들어, 52세 남자 환자에게 이식할 매트릭스의 구성은 80 mg/mL ~ 160 mg/mL 피

리노겐, 10 mg/mL ~ 20 mg/mL 콜라겐의 농도를 제조하여 피브리노겐 0.3 mL과 콜라

0.1 mL을 혼합하여 이식할 피브리노겐 매트릭스를 준비한다.

리고, 실시에 1과 같이 환부에 관절경을 투입하기 위한 구멍을 뚫고 관절경을 집어

어 이식 부위를 깨끗이 다듬고 환부에 지름 3mm, 깊이 5mm의 구멍을 약 4개 정도(

자의 병변 크기는 약 4cm) 뚫어 이식할 준비를 한다.

속하여, 연골세포 성분에 1 IU/mL ~ 10 IU/mL 농도의 트롬빈을 넣어 준 후 연골세

성분과 콜라겐이 혼합된 피브리노겐 매트릭스를 혼합한 연골치료제 조성물을 결손

위에 채워 나간다.

이후 과정은 실시예1과 같이 동일하다.

때, 상기 피브리노겐에 다른 혼합물을 첨가하여 형성되는 피브리노겐 매트릭스를

식하는 경우는 환자의 상태와 나이에 따라 피브리노겐에 첨가되는 혼합물이 달라질

있으며, 환자의 나이가 많을 경우, 콜라겐과 히알루로닉산 같은 매트릭스 성분을

골치료제와 혼합하여 사용할 수 있다.

상과 같이 피브리노겐 매트릭스에서 연골 세포가 분화된 패턴이 도4에 도시되어 있

며, 10%의 콜라겐과 10%의 히알루로닉산이 포함된 피브리노겐 매트릭스에서의 연골

세포의 분화패턴이 도5에 도시되어 있다.

실시예 3)

막을 사용하여 연골치료제 조성을 주입한 경우.

처. 환자로부터 연골 조직을 채취하여 조직으로부터 세포를 분리한 후 배양하여 약 00 만개 이상의 연골 세포와 0.4mL의 DMEM 배양액으로 이루어진 연골치료제를 만든

음. 의약품으로 나와 있는 피브린 실란트를 준비한 후 동결 건조 상태의 피브리노 바이알에 DMEM 배양액을 넣어 피브리노겐의 농도를 50 mg/mL ~ 80 mg/mL 의 농도로 용해시킨다.

한. 동결 건조 상태의 트롬빈 바이알에 DMEM 배양액을 첨가하여 500 IU/mL 농도로 해시킨다.

리고. 연골치료제 조성을 이식할 부위를 수술 도구를 이용하여 매끄럽게 다듬어 다.

상의 과정이 끝난 후 환자의 무릎에서 골막을 채취한 후 이식 부위에 조심스럽게 합한다.

합 후 봉합한 골막의 소실이 있는지 실란트를 빌라 확인하다.

어서. 미리 제조된 연골세포 성분에 용해된 트롬빈 용액을 1 IU/mL ~ 10 IU/mL 정의 농도가 되도록 첨가한 후 잘 섞어준다.

리고. 트롬빈이 혼합된 0.4mL 연골세포 성분과 0.4mL 피브리노겐 용액을 잘 혼합하여 이식용 조성을 형성하고. 상기 조성을 주사기를 이용하여 도2c와 같이 환부의 골막 안으로 주입 한다.

때, 상기 피브리노겐은 트롬빈과 반응하여 피브린으로 된 후 응고가 일어나므로 신

해 진행해야 한다.

【시례 4】

피브리노겐에 히알루로닉산 및 GAG를 첨가한 피브리노겐 매트릭스와 트롬빈이

가된 세포성분의 혼합물로 이루어진 조성물을 주입한 경우

통사고를 당하여 연골에 손상을 입은 27세 남자의 연골 조직 일부를 제취하여 배양

여 약 3×10^7 cells/mL의 연골세포를 준비한다.

브리노겐 매트릭스의 구성으로는 피브리노겐 50 mg/mL ~ 100 mg/mL의 농도, 10

/mL 히알루로닉산, 5 mg/mL ~ 10 mg/mL의 GAG를 준비한다.

통사고에 의한 연골 손상으로 환자의 병변 크기가 4~8cm 이므로 50 mg/mL ~ 100

/mL 피브리노겐 0.5 mL, 10 mg/mL 히알루로닉산 0.2 mL, 5 mg/mL ~ 10 mg/mL GAG

2 mL를 혼합한다.

골치료제를 이식할 부위를 잘 다듬고 손상 부위의 크기에 따라, 지름 3mm, 깊이

mm의 구멍을 2~5개 정도 뚫는다.

리고, 5 IU/mL 트롬빈이 혼합된 연골세포 성분과 3가지가 혼합된 피브리노겐 매트

릭스를 준비한다.

속하여, 500 IU/mL의 고농도 트롬빈을 스프레이 텁을 이용하여 이식할 부위에 골고

분사 시킨 후 연골세포 성분 0.9 mL과 3가지 성분이 혼합된 피브리노겐 매트릭스

혼합한다.

합된 연골세포 성분-피브리노겐 매트릭스 (히알루로닉산+GAG)로 이루어진 조성물을

식 부위의 구멍부터 천천히 채워 나간다.

식한 부위에 500 IU/mL의 고농도 트롬빈을 다시 투여한 후 약 5분간 방치하고, 경

가 완료되면 이식을 마친다.

때, 환자가 젊은 경우 연골 조직의 탄력성은 좋으나 외상에 의한 연골 부위의 매끄러움이 덜하기 때문에 이런 점을 보완하기 위해 히알루로닉산이나 GAG 등을 사용하여 죽한 면은 보완하여 연골 재생이 용이하게 일어나게 할 수 있다.

발명의 효과】

이상 설명한 바와 같이 본 발명에 의하면, 연골치료제의 누수를 방지하며 형태유지하기에 수술 과정이 간편하며 생체내 기질 성분과 같이 이식함으로 인해 보다 우수한 연골 생성능을 유지할 수 있는 장점이 있다.

또한, 골막의 통합을 하지 않을 경우 수술 시간을 단축시킬 수 있으며, 관절경 이용하여 수술할 수 있기에 수술 과정이 간편하며 생체내 기질 성분과 같이 이식으로 인해 보다 우수한 연골 생성능을 유지하고, 무릎 절개가 불필요하게 되는 효과가 있다.

본 발명은 특정한 실시예에 관련하여 도시하고 설명 하였지만, 이하의 특허청구권에 의해 제공되는 본 발명의 정신이나 문아를 벗어나지 않는 한도 내에서 본 발명이 다양하게 개량 및 변화될 수 있다는 것을 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자는 용이하게 알 수 있음을 밝혀 두고자 한다.

특허청구범위】

【구항 1】

숙주로부터 분리되고 증식 또는 분화된 연골세포 성분과, 트롬빈 및, 피브리노겐

포함하는 피브리노겐 매트릭스의 혼합물로 이루어진 연골치료제 조성물.

【구항 2】

제1항에 있어서,

상기 세포성분은, 숙주로부터 분리된 정상 연골 조직을 효소를 이용하여 세포로

분리한 후 배양액을 첨가하고, 100만개/mL 이상의 연골 세포를 함유하는 것으로 이

어진 연골치료제 조성물.

【구항 3】

제1항에 있어서,

상기 트롬빈은 0.01~50 IU/mL의 트롬빈이 사용되는 것을 특징으로 하는 연골치

제 조성물.

【구항 4】

제1항에 있어서,

상기 피브리노겐 매트릭스는, 20~200mg/mL의 농도로 첨가되는 피브리노겐이 사

되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조성물.

【구항 5】

제1항 또는 제4에 있어서,

상기 피브린노겐 매트릭스는, 페니실린 G, 스트렙토마이신 등의 항생제 및 카나
이신, 앰포테리신 B, 니스타린, 젠타마이신 등의 항진균제 등에서 선택되는 어느
나 이상이 첨가되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조성물.

【구항 6】

제1항 또는 제4항에 있어서.

상기 피브리노겐 매트릭스는, 0.01~20mg/mL 콜라겐, 0.1~20mg/mL 하일루로닉산
0.1~20mg/mL GAG, 1~3000KIU/mL 아프로티닌 등에서 선택되는 어느 하나 이상이 첨
되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조성물.

【구항 7】

숙주의 연골로부터 분리되어 증식 또는 분화된 연골 세포성분을 준비하는 단계:

트롬빈을 준비하는 단계:

피브리노겐 매트릭스를 준비하는 단계:

연골의 결손부위를 처리하는 단계: 및.

결손부위에 연골세포성분, 트롬빈과 피브리노겐 매트릭스를 혼합한 연골치료제
성물을 주입하는 단계를 포함하는 연골치료제 조성물의 사용방법.

【구항 8】

제7항에 있어서.

연골의 결손부위를 처리하는 단계는, 결손부위에 소정의 직경과 깊이를 갖는 다
의 접합공이 연골 결손 부위와 일체로 형성되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조
물의 사용방법.

【구항 9】

제7항 또는 제8항에 있어서.

상기 결손부위에 연골세포성분, 트롬빈과 피브리노겐을 혼합하여 주입하는 단계
그 전, 후단계에 100~1000 IU/mL인 트롬빈 용액을 접합공을 포함한 연골 결손 부
에 분사하는 단계가 추가되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조성물의 사용방법.

【구항 10】

제7항에 있어서.

상기 피브리노겐 매트릭스는, 0.01~20mg/mL의 콜라겐, 0.1~20mg/mL 히알루로닉
및 0.1~20mg/mL GAG, 1~3000KIU/mL 아프로티닌 성분중에서 선택되는 어느 하나 이
이 더 첨가되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조성물의 사용방법.

【구항 11】

숙주의 연골로부터 분리되어 증식 또는 분화된 연골세포성분을 준비하는 단계:

트롬빈을 준비하는 단계:

피브리노겐 매트릭스를 준비하는 단계:

연골의 결손부위를 처리하는 단계:

골막을 채취하는 단계:

골막을 결손부위에 통합하는 단계: 및.

골막의 내측의 결손부위에 연골세포 성분, 트롬빈과 피브리노겐 매트릭스를 혼
한 연골치료제 조성물을 주입하는 단계를 포함하는 연골치료제 조성물의 사용방법.

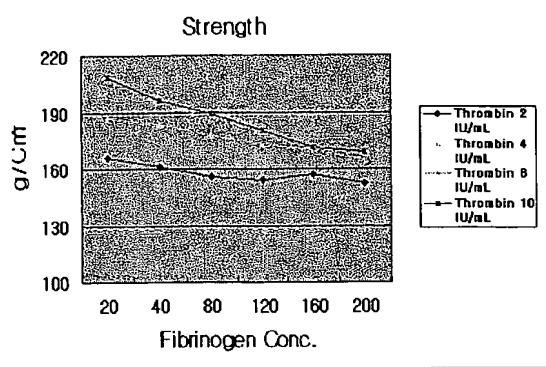
【구항 12】

제11항에 있어서,

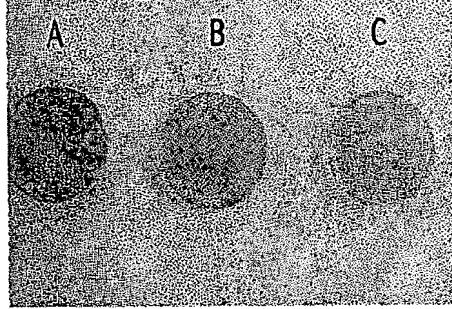
상기 피브리노겐 매트릭스는, 0.01~20mg/mL 의 콜라겐, 0.1~20mg/mL 히알루로닉
및 0.1~20mg/mL GAG, 1~3000KIU/mL 아프로티닌 성분중에서 선택되는 어느 하나 이
아 더 첨가되는 것을 특징으로 하는 연골치료제 조성물의 사용방법.

【도면】

1a)



1b)

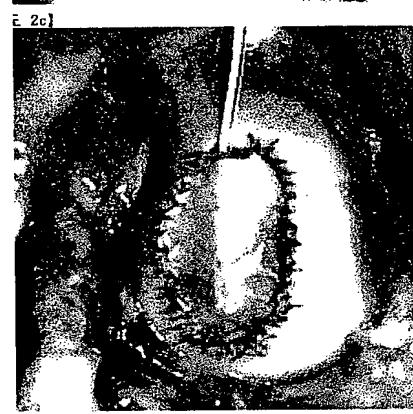
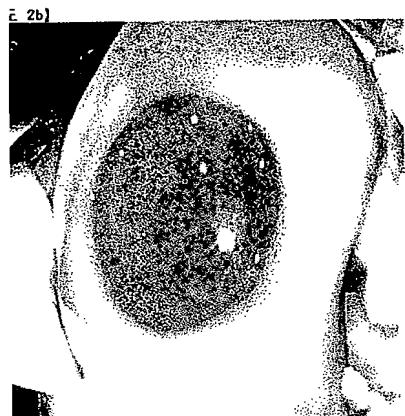


BEST AVAILABLE COPY



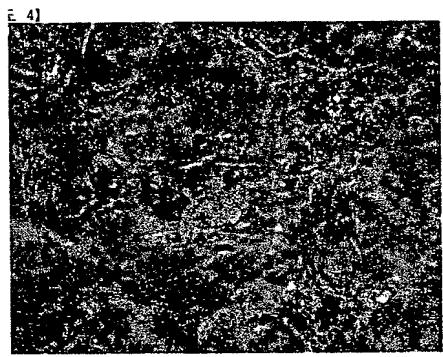
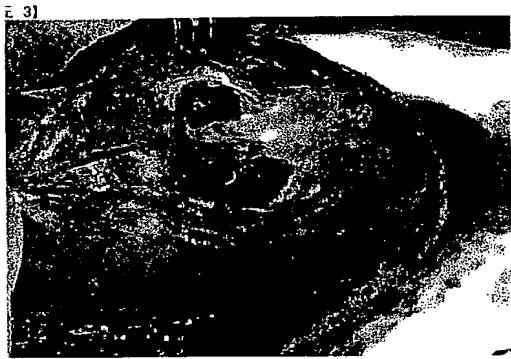
33-30

BEST AVAILABLE COPY



33-31

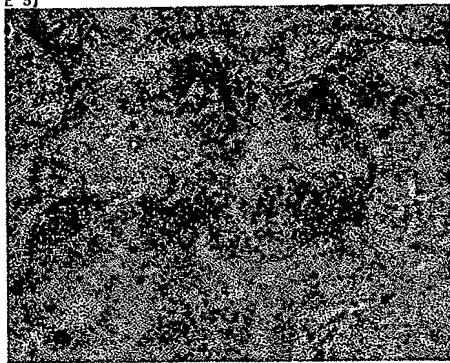
BEST AVAILABLE COPY



33-32

BEST AVAILABLE COPY

E 5]



33-33

DESI AVAILABILITY COPY

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003204

International filing date: 07 December 2004 (07.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0095340
Filing date: 23 December 2003 (23.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 02 February 2005 (02.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse